

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Physiologische Parameter während der Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika

Während der Präkonditionierungsphase mit volatilen Anästhetika wurden bei einer repräsentativen Anzahl von Tieren aus jeder Behandlungsgruppe die physiologischen Parameter überwacht und protokolliert. Einerseits war von Interesse, welchen Einfluss eine dreistündige Isofluran- oder Halothannarkose auf den Organismus ausübt, andererseits half uns die Überwachung der physiologischen Parameter, eine Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen zu gewährleisten.

	pH	PaCO <sub>2</sub> mmHg	PaO <sub>2</sub> mmHg	MABD mmHg	Glukose mmol/l	Temperatur °C
Kontrollgruppe (n=7)						
arterieller Zugang	7,41±0,02	44,6±5,9	130,3±13,4	84,9±10,0	7,9±1,2	37,1±0,9
90 Minuten	7,43±0,02	36,7±8,0	102,7±6,2	81,8±11,5	7,6±1,8	37,0±0,6
180 Minuten	7,44±0,02	34,9±7,5	102,3±5,7	79,4±13,5	6,9±1,9	36,9±0,5
Halothan + O <sub>2</sub> (n=8)						
arterieller Zugang	7,37±0,02	44,3±3,9	128,1±25,0	85,2±15,8	7,5±1,5	37,1±0,7
90 Minuten	<b>7,29±0,04*</b>	<b>53,2±5,7*</b>	128,3±33,2	<b>61,2±5,7*</b>	7,2±1,8	36,8±0,7
180 Minuten	<b>7,25±0,04*</b>	<b>54,9±6,0*</b>	105,8±20,8	66,9±13,3	6,3±1,5	36,9±0,5
Halothan (n=6)						
arterieller Zugang	7,40±0,06	47,3±4,8	129,2±26,8	79,2±12,9	8,5±1,8	36,9±0,9
90 Minuten	7,36±0,12	49,6±6,5	74,3±25,5	59,6±7,4	7,3±1,6	37,2±0,3
180 Minuten	<b>7,33±0,08*</b>	<b>54,6±6,5*</b>	<b>63,4±13,2*</b>	64,5±9,6	7,2±1,6	36,8±0,5
Isofluran (n=8)						
arterieller Zugang	7,41±0,03	42,2±4,7	123,2±54,3	80,7±9,3	8,5±1,3	36,8±0,2
90 Minuten	7,40±0,02	38,6±2,5	90,6±5,7	68,2±11,7	7,0±0,6	37,2±0,5
180 Minuten	7,39±0,02	38,2±3,1	88,7±5,9	<b>64,4±9,4*</b>	6,7±0,6	36,9±0,7

**Tabelle 4: Physiologische Parameter während der Präkonditionierungsphase** (Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung) Die in der Tabelle markierten Werte weichen signifikant von den korrespondierenden Werten der Kontrollgruppe mit \*p < 0,05 ab.

Gemessen wurde der arterielle pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, der mittlere arterielle Blutdruck (MABD), Glukose und die Körpertemperatur. Protokolliert wurden diese Werte unmittelbar nach dem Legen des arteriellen Zugangs (Beginn des Experimentes), nach 90 Minuten und nach 180 Minuten (siehe Tabelle 4).

Im ersten Experiment erfolgte die Präkonditionierung mit Halothan und Isofluran. Während der Versuchsreihe zeigte sich nach 180 Minuten bei den mit Halothan behandelten Ratten eine signifikante Abweichung des arteriellen PaO<sub>2</sub> ( $63,4 \pm 13,2$  mmHg) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $102,3 \pm 5,7$  mmHg) und zur Isoflurangruppe ( $88,7 \pm 5,9$  mmHg). Ein arterieller PaO<sub>2</sub> von ca. 60 mmHg entspricht einer relevanten Hypoxie. Auch der arterielle pH-Wert mit  $7,33 \pm 0,08$  und PaCO<sub>2</sub> mit  $54,6 \pm 6,5$  mmHg stellte eine leichte respiratorische Azidose nach 180 Minuten Halothanbehandlung dar und unterschied sich signifikant von den korrespondierenden Werten der Kontrollgruppe. Aufgrund der niedrigen PaO<sub>2</sub>-Werte wurde in dieser Versuchsreihe eine weitere Behandlungsgruppe hinzugefügt, bei der die Ratten zusätzlich 10 % Sauerstoff während der Präkonditionierungsphase mit Halothan erhielten. Die zusätzliche Sauerstoffinsufflation bewirkte eine Anhebung des PaO<sub>2</sub> auf  $105,8 \pm 20,8$  mmHg, die atemdepressive Wirkung des Halothans konnte jedoch nicht eliminiert werden. Die respiratorische Azidose mit pH von  $7,29 \pm 0,04$  und PaCO<sub>2</sub> von  $53,2 \pm 5,7$  mmHg zeigte sich bereits nach 90 Minuten Behandlung und verstärkte sich nach 180 Minuten mit einem pH von  $7,25 \pm 0,04$  und PaCO<sub>2</sub> von  $54,9 \pm 6,0$  mmHg.

Weiterhin zeigte nach 90 Minuten Halothan + O<sub>2</sub> Behandlung der MABD mit  $61,2 \pm 5,7$  mmHg eine signifikante Abweichung vom korrespondierenden MABD- Wert des Kontrollexperimentes.

Der mittlere arterielle Blutdruck (MADB) der mit Isofluran behandelten Tiere wich nach 180 Minuten mit  $64,4 \pm 9,4$  mmHg signifikant vom MADB der Kontrollgruppe ( $79,4 \pm 13,5$  mmHg) ab.

Die arteriellen Glukosewerte und die Körpertemperatur der unterschiedlich behandelten Ratten wiesen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede bezüglich der Kontrollgruppe auf.

### **3.2 Physiologische Parameter während der MCAO**

Der Experimentator wurde bezüglich der verschiedenen Behandlungsgruppen der Ratten verblindet. Alle Tiere aus jeder Gruppe wurden während der Okklusion der Arteria cerebri media identisch behandelt.

In Tabelle 5 wurden die physiologischen Parameter aus den ersten Versuchsreihen mit den Behandlungsgruppen Halothan 24 h, Halothan + O<sub>2</sub> 24 h, Isofluran 0 h, Isofluran 12 h, Isofluran 24 h, Isofluran 48 h und Kontrollgruppe aufgezeigt. Beginn der Ischämie war der Zeitpunkt der Durchführung der MCAO bei gleichzeitigem Verschluss der Aa. carotides communes dextra et sinistra. Bei Ende der Ischämie wurden die Aa. carot. communes dextra et sinistra wieder eröffnet. Dieses erfolgte nach 60 Minuten Ischämiezeit.

	pH	PaCO <sub>2</sub> mmHg	PaO <sub>2</sub> mmHg	MABD mmHg	Glukose mmol/l	Temperatur °C
Kontrollgruppe (n=13)						
Beginn der Ischämie	7,38±0,05	44,7±5,7	138,8±4,8	83,3±11,1	6,8±1,3	37,0±0,5
Ende der Ischämie	7,39±0,03	42,1±5,0	114,1±12,2	69,8±9,5	7,6±1,8	37,4±0,4
Halothan bei 24h (n=7)						
Beginn der Ischämie	7,38±0,04	46,1±5,8	145,8±20,4	76,5±12,1	8,7±2,2	37,4±0,4
Ende der Ischämie	7,37±0,05	43,1±6,2	136,1±18,2	70,9±9,8	6,9±1,6	37,4±0,6
Halothan + O <sub>2</sub> bei 24h (n=11)						
Beginn der Ischämie	7,37±0,03	44,3±5,4	156,4±23,2	79,2±10,4	8,0±1,0	37,2±0,6
Ende der Ischämie	7,36±0,04	46,8±3,6	127,1±22,5	61,4±10,4	6,5±0,8	37,4±0,5
Isofluran bei 0h (n=13)						
Beginn der Ischämie	7,42±0,06	41,6±6,6	122,3±18,2	93,3±14,0	7,0±2,0	37,1±0,5
Ende der Ischämie	7,41±0,03	41,9±5,1	111,7±18,9	79,0±13,9	5,5±1,3	37,4±0,5
Isofluran bei 12h (n=14)						
Beginn der Ischämie	7,38±0,02	46,1±3,7	138,4±10,4	81,7±10,7	6,2±1,6	36,9±0,7
Ende der Ischämie	7,37±0,03	47,2±6,2	133,5±15,3	72,5±7,7	8,9±3,3	37,2±0,4
Isofluran bei 24h (n=15)						
Beginn der Ischämie	7,39±0,02	43,3±4,5	141,8±17,6	80,1±10,4	6,9±0,6	36,7±0,07
Ende der Ischämie	7,38±0,03	44,9±3,6	133,5±15,3	61,4±10,0	5,2±0,9	37,5±0,4
Isofluran bei 48h (n=15)						
Beginn der Ischämie	7,38±0,05	42,7±6,3	149±20,3	88,6±12,2	7,1±1,4	36,7±0,5
Ende der Ischämie	7,37±0,03	46,2±5,8	124±24,8	71,3±14,8	6,6±0,9	37,2±0,6

**Tabelle 5: Physiologische Parameter während der MCAO.** Gemessen wurde zu Beginn der Ischämie und 60 Minuten danach, bei Ende der Ischämie. Alle gemessenen physiologischen Daten zwischen den einzelnen Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Die Werte lagen innerhalb der physiologischen Normbereiche. (Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung).

Tabelle 6 stellt die physiologischen Parameter aus der Versuchsreihe zur Inhibierung der iNOS-Aktivität mit Aminoguanidin (AG) mit den Behandlungsgruppen Kontrolle + NaCl, Kontrolle + AG, Isofluran + NaCl und Isofluran + AG während der MCAO dar. Auch hier sind keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Behandlungsgruppen zu verzeichnen.

	pH	PaCO <sub>2</sub> mmHg	PaO <sub>2</sub> mmHg	MABD mmHg	Glukose mmol/l	Temperatur °C
Kontrollgruppe +NaCl (n=11)						
Beginn der Ischämie	7,41±0,07	44,3±8,0	118,7±15,0	90,4±15,0	7,4±2,4	36,8±0,5
Ende der Ischämie	7,43±0,03	42,3±5,3	116,4±13,0	83,5±8,3	7,1±1,9	37,2±0,6
Kontrollgruppe +AG (n=11)						
Beginn der Ischämie	7,43±0,05	39,8±5,3	122,3±18,7	92,5±13,0	7,1±1,9	37,0±0,4
Ende der Ischämie	7,43±0,03	39,6±4,4	113,7±13,1	77,5±9,3	6,7±2,1	37,2±0,7
Isofluran bei 24h (n=8)						
Beginn der Ischämie	7,43±0,05	40,9±5,9	107,6±9,1	95,5±20,1	7,9±1,8	37,3±0,5
Ende der Ischämie	7,43±0,04	38,8±4,7	102,4±15,2	79,1±10,6	7,0±1,3	37,2±0,5
Isofluran bei 24h+ AG (n=8)						
Beginn der Ischämie	7,43±0,03	42,7±4,2	108,0±11,3	89,1±14,7	7,9±1,2	36,9±0,6
Ende der Ischämie	7,45±0,03	39,3±5,4	111,8±21,9	78,2±12,9	6,7±1,4	37,4±0,4

**Tabelle 6: Physiologische Parameter während der MCAO bei Behandlung der Ratten mit Aminoguanidin (AG).** Während der einstündigen Ischämiephase der MCAO bestanden keine signifikanten Unterschiede innerhalb der unterschiedlich behandelten Gruppen. (Werte: Mittelwerte ± Standardabweichung).

### 3.3 Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika ist neuroprotektiv

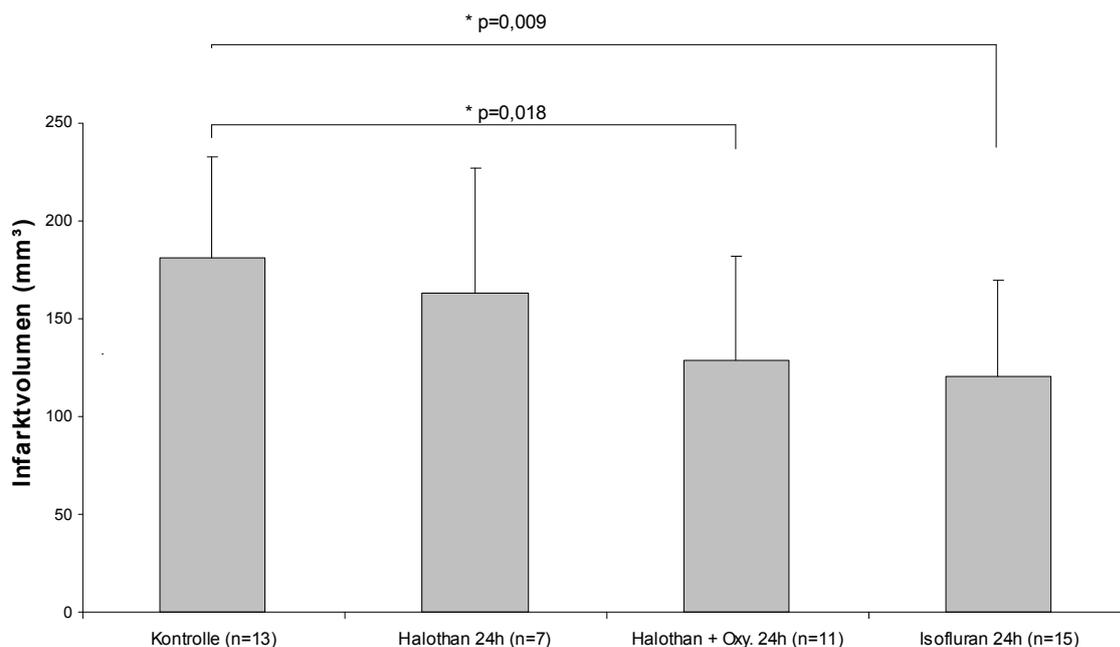
#### 3.3.1 Vergleich des neuroprotektiven Effektes von Halothan und Isofluran

In der ersten Versuchsreihe wurde der neuroprotektive Effekt der Anästhetika aus der Gruppe der halogenierten volatilen Anästhetika untersucht. Es wurden vier Gruppen gebildet. Bei den Ratten der Gruppe 1 wurde eine Präkonditionierung mit Isofluran, in der Gruppe 2 mit Halothan, in der Gruppe 3 mit Halothan und Sauerstoff durchgeführt. Die Gruppe 4 erhielt als Kontrollgruppe keine Vorbehandlung. 24 Stunden später wurde bei allen Ratten eine MCAO durchgeführt (siehe Abbildung 10). Die Gruppe der

unbehandelten Tiere zeigte nach Auswertung der Infarkt volumina ein gemittelt es Infarktvolumen von  $180 \pm 51 \text{ mm}^3$ .

Eine dreistündige Isofluranpräkonditionierung vor der MCAO bewirkte eine signifikante Reduzierung des gemittelten Infarktvolumens auf  $120 \pm 49 \text{ mm}^3$  ( $p = 0,009$ ). Dieses entspricht eine Verringerung des Infarktvolumens um 33,3 %.

Eine alleinige Halothanpräkonditionierung bewirkte eine Reduzierung des gemittelten Infarktvolumens auf  $163 \pm 63 \text{ mm}^3$ , jedoch war dieses Ergebnis bezüglich der Kontrollgruppe nicht signifikant. Erst der Ausgleich der Hypoxie durch die Kombination von Halothan und Sauerstoff als Präkonditionierungsstimulus führte zu einer signifikanten Reduzierung des gemittelten Infarktvolumens auf  $121 \pm 48 \text{ mm}^3$  ( $p = 0,018$ ).

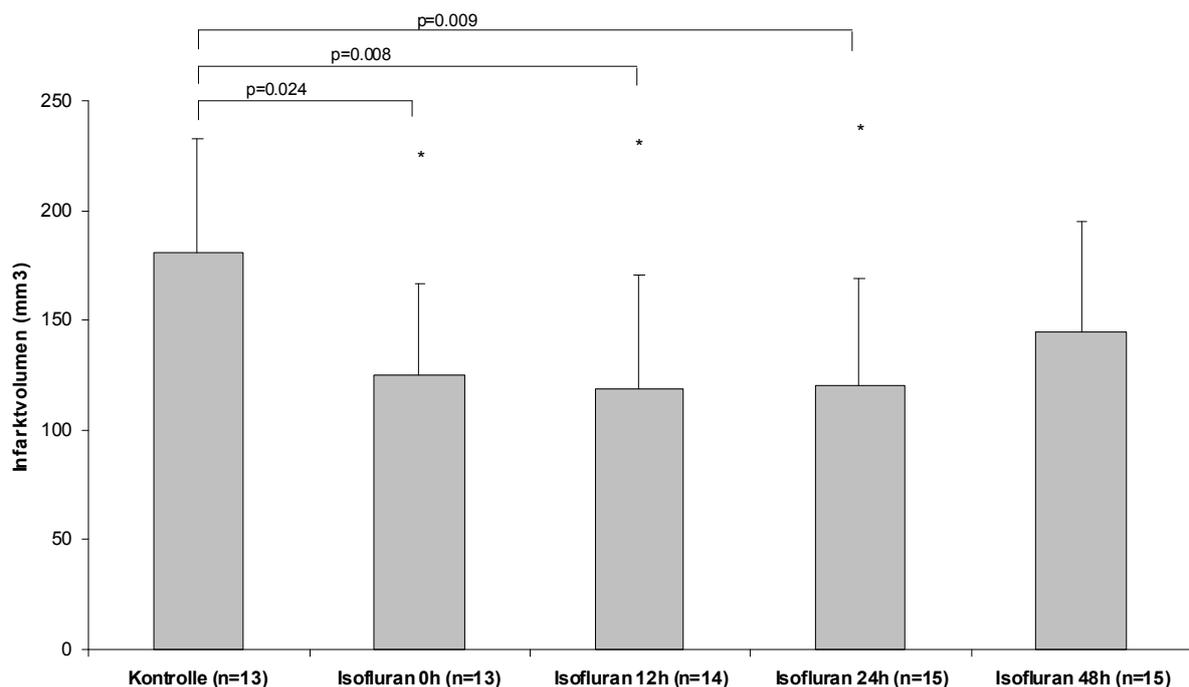


**Abbildung 10: Präkonditionierung mit volatilen Anästhetika führen zu verminderter Infarktgröße.**

Die Ordinate stellt die Infarktgröße in  $\text{mm}^3$  dar, auf der Abszisse befinden sich die unterschiedlich behandelten Gruppen im Vergleich. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der mit Isofluran präkonditionierten Gruppe und der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ) sowie der mit Halothan +  $\text{O}_2$  präkonditionierten Gruppe und der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ), (Werte: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

### 3.3.2 Die Effektivität der Isofluranpräkonditionierung ist zeitabhängig

Bisher wurde der neuroprotektive Effekt Isoflurans 24 Stunden nach Präkonditionierung untersucht. Zur Untersuchung des Zeitpunktes der maximalen Wirkung der Präkonditionierung sowie die Dauer der Neuroprotektion wurden insgesamt vier Zeitpunkte untersucht. Dies waren im Einzelnen der Zeitpunkt direkt im Anschluss sowie 12 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach Präkonditionierung.



**Abbildung 11: Zeitverlauf der neuroprotektiven Wirkung durch Präkonditionierung mit Isofluran.**

Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Zeitpunkte der MCAO nach Präkonditionierung dargestellt. Bereits im Anschluss an die drei stündige Präkonditionierung wurde eine Neuroprotektion von 30,5 % erreicht. Die maximale Protektion beträgt nach 12 h 34,4 % Neuroprotektion gegen die Negativkontrolle. Bis zu 24 h nach Präkonditionierung ist eine signifikante Neuroprotektion vorhanden, danach verringert sich der protektive Effekt und ist 48 h nach Präkonditionierung nicht mehr statistisch signifikant (Werte: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Mit einem gemittelten Infarktvolume von  $118 \pm 51 \text{ mm}^3$  ( $p = 0,008$ ) zwölf Stunden nach Präkonditionierung war dies die maximal ermittelte Neuroprotektion. Auch unmittelbar nach der Präkonditionierung zum Zeitpunkt 0 konnte bereits eine Neuroprotektion mit einer signifikanten Reduzierung des gemittelten Infarktvolume auf  $125 \pm 42 \text{ mm}^3$  ( $p =$

0,024) gezeigt werden. 48 Stunden nach Präkonditionierung ist noch eine Reduzierung des gemittelten Infarktvolumens vorhanden, jedoch mit  $144 \pm 50 \text{ mm}^3$  ( $p = 0,27$ ) nicht mehr signifikant bezüglich des gemittelten Infarktvolumens des Kontrollexperimentes (siehe Abbildung 11).

Mit diesem groben Zeitraster konnte gezeigt werden, dass die maximale Neuroprotektion im Zeitintervall von 0 bis 24 Stunden nach Präkonditionierung möglich ist, bereits unmittelbar nach Präkonditionierung Neuroprotektion existiert, diese nach ca. 24 Stunden nachlässt und nach 48 Stunden nicht mehr signifikant nachweisbar ist.

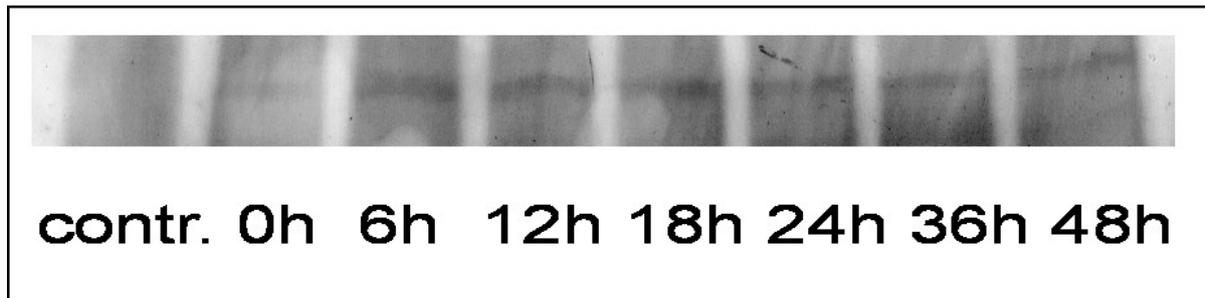
### **3.4 Anästhetische Präkonditionierung mit Isofluran induziert iNOS**

Die Frage nach den zellulären Anpassungsmechanismen konnten wir teilweise mit Hilfe der Western-Blot-Analysen von homogenisierten kortikalen Anteilen des Gehirns mit Isofluran präkonditionierter Ratten klären.

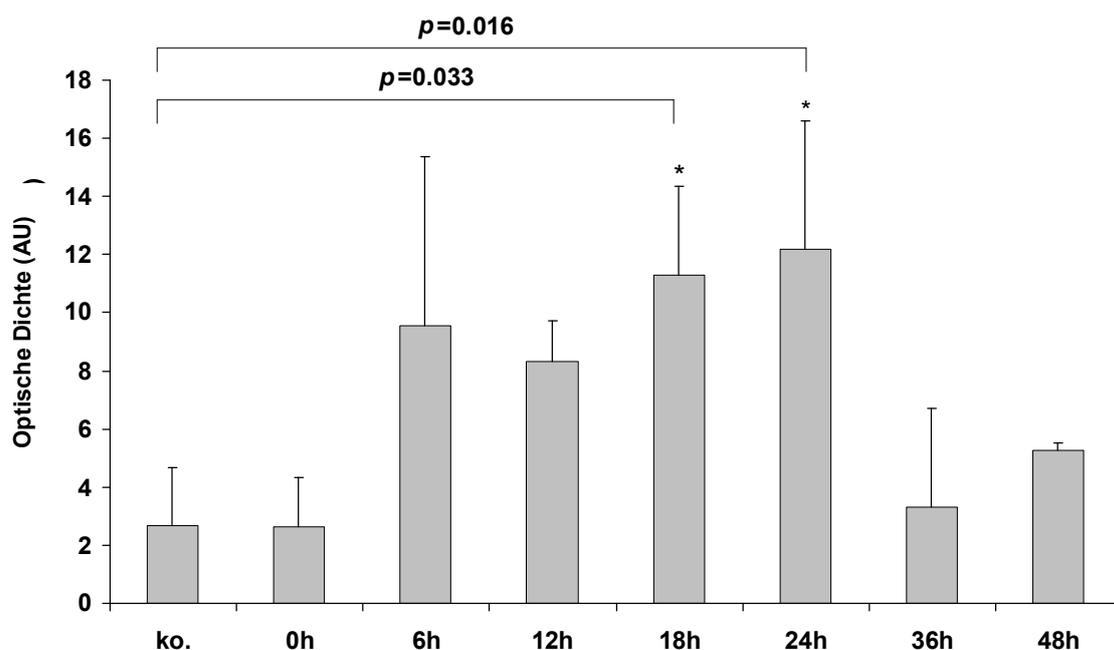
Die Western-Blot-Analysen wurden von jeweils drei Tieren für die unbehandelte Kontrollgruppe sowie für die Zeitpunkte 0 h, 6 h, 12 h, 18h, 24 h, 36 h und 48 h nach anästhetischer Präkonditionierung mit Isofluran durchgeführt.

Nach Inkubation mit iNOS-Antikörper ließ sich 6 Stunden bis 48 Stunden nach Präkonditionierung mit Isofluran die Induktion von iNOS darstellen (siehe Abbildung 12). Mit Hilfe densitometrischer Analysen konnte die vorhergehende Beobachtung objektiviert werden (siehe Abbildung 13). 18 Stunden nach Isofluranpräkonditionierung zeigte sich bezüglich der Kontrolle eine signifikante Expression des iNOS-Proteins mit einer optischen Dichte von  $11,28 \pm 3,07 \text{ AU}$  ( $p = 0,033$ ). Auch die Kontrollgruppe zeigt eine geringfügige Expression des iNOS-Proteins mit  $2,66 \pm 2,01 \text{ AU}$ . Die maximale Induktion des iNOS-Proteins tritt 24 Stunden nach Präkonditionierung mit einer signifikanten optischen Dichte von  $12,19 \pm 4,4 \text{ AU}$  ( $p = 0,016$ ) auf. Zum Zeitpunkt 36 h ist die Expression des iNOS-Proteins mit  $3,31 \pm 3,4 \text{ AU}$  nicht mehr signifikant vom Kontrollexperimentes abzugrenzen.

Mit diesem Versuch konnte die Induktion von iNOS durch Präkonditionierung mit Isofluran dargestellt werden. iNOS ist somit möglicherweise ein Effektor der Neuroprotektion, welche durch Isofluran induziert wird.



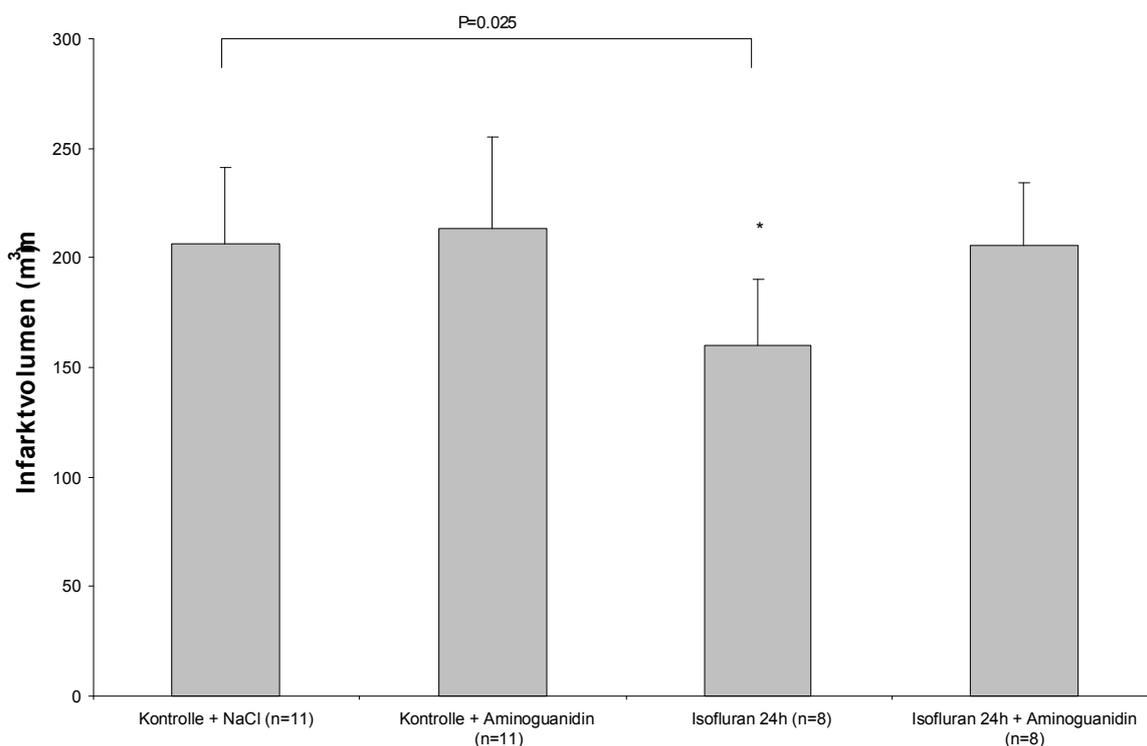
**Abbildung 12: Western-Blot-Analysen der kortikalen Gehirnteile von iNOS zu verschiedenen Zeitpunkten.** Die Ratten wurden 3 h mit Isofluran präkonditioniert und zu verschiedenen Zeitpunkten danach dekapitiert, um die kortikalen Hirnanteile auf deren iNOS-Expression im Western-blot zu untersuchen. Ab 6 h nach Präkonditionierung mit Isofluran ist bereits eine Bande im Westernblot zu erkennen.



**Abbildung 13: Densiometrische Analysen des Western-Blots.** Zur Objektivierung der vorhergehende Beobachtung durch densiometrische Analysen des Western-Blots durch Subtraktion der Untergrundfärbung der dargestellten Banden ergänzt. Nach 18 h waren signifikante Intensitätsunterschiede der Banden zu verzeichnen. Die optische Dichte AU betrug hier  $11,28 \pm 3,07$  im Vergleich zur Kontrolle mit  $2,66 \pm 2,01$ . Nach 24 h hatte die optische Dichte ihr Maximum mit AU von  $12,19 \pm 4,4$  erreicht, um nach 36 h wieder nachzulassen. Die Daten wurden von drei unabhängigen Experimenten wermittelt (Werte: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

### 3.5 Inhibierung der iNOS-Aktivität mit Aminoguanidin eliminiert die Neuroprotektion nach Präkonditionierung mit Isofluran

Um die Hypothese zu bestätigen, dass die Induktion der iNOS Expression durch Präkonditionierung kausal an der Neuroprotektion beteiligt ist, wurde eine weitere Versuchsreihe in vivo durchgeführt. In diesem Experiment wurde die iNOS-Aktivität durch Aminoguanidin gehemmt. Aminoguanidin wurde den Ratten zu Beginn der Präkonditionierung und 12 Stunden danach intraperitoneal appliziert. Bei der Infarktauswertung zeigte sich, dass diese Behandlung den neuroprotektiven Effekt des Isoflurans eliminiert. Das gemittelte Infarktvolumen von  $206 \pm 29 \text{ mm}^3$  der mit Isofluran und Aminoguanidin behandelten Gruppe unterschied sich nicht signifikant gegenüber dem gemittelten Infarktvolumen der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe ( $V = 206 \pm 35 \text{ mm}^3$ ) und der nur mit Aminoguanidin behandelten Kontrollgruppe ( $V = 213 \pm 42 \text{ mm}^3$ ; siehe AAbbildung 14).



**Abbildung 14: iNOS ist ein Vermittler der Neuroprotektion durch Präkonditionierung mit Isofluran.**

In diesem Experiment wurde die Beteiligung von iNOS an der Neuroprotektion mit Isofluran durch Hemmung mit Aminoguanidin nahe gelegt. Wurde den Ratten intraperitoneal Aminoguanidin während der Präkonditionierungsphase injiziert, so ließ sich keine Neuroprotektion nachweisen. Die Gruppe der mit Isofluran und AG behandelten Tiere wiesen ein ebenso großes Infarktvolumen wie die Kontrollgruppe auf (Werte: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

Die Behandlungsgruppe, die nur der Isofluranpräkonditionierung ausgesetzt war, wies ein gemittelttes Infarktvolumen von  $160 \pm 31 \text{ mm}^3$  auf und war damit signifikant kleiner als das Infarktvolumen der mit NaCl behandelte Kontrollgruppe ( $p = 0,025$ ) sowie der mit Isofluran und Aminoguanidin behandelten Gruppe. Dieses Experiment zeigt, dass der neuroprotektive Effekt Isoflurans mit Aminoguanidin eliminiert werden kann. Die Behandlung mit Aminoguanidin hat keinen Einfluss auf die Infarktgröße nach MCAO.

### **3.6 Anzahl der vom Experiment ausgeschlossenen Tiere**

Gemäß der in Abschnitt 2.2.1 gestellten Ausschlußkriterien wurden insgesamt 6 Tiere vor dem Beenden des Experimentes aus den folgenden Experimentgruppen ausgeschlossen:

Kontrollgruppe	2 Ratten
Präkondition Halothan und Sauerstoff	1 Ratte
Präkondition Isofluran 0 h	1 Ratte
Präkondition Isofluran 12 h	1 Ratte
Kontrollgruppe mit Aminoguanidin	1 Ratte